

令和 5 年 6 月 22 日現在

機関番号：13601  
研究種目：基盤研究(C) (一般)  
研究期間：2020～2022  
課題番号：20K07405  
研究課題名(和文) 自己免疫性膵炎発症に関与するサイトカインのメチル化異常の解析と病理診断への応用

研究課題名(英文) Analysis of abnormal methylation of cytokines involved in the pathogenesis of autoimmune pancreatitis and its application to pathological diagnosis

研究代表者  
上原 剛 (Uehara, Takeshi)  
信州大学・学術研究院医学系・准教授

研究者番号：80402121  
交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：自己免疫性膵炎(AIP)のサイトカインおよびサイトカイン関連因子のメチル化異常についてイルミナ社のInfinium MethylationEPIC Kitを用いて全ゲノム網羅的なメチル化アレイ解析を行った。メチル化アレイ解析はAIPの炎症部、膵臓癌の閉塞性膵炎部およびそれぞれの所属リンパ節に対して行った。ヒートマップ解析で系統的なメチル化異常は見いだせなかった。一方で解析の中で、炎症全体を制御するサイトカイン関連因子にメチル化異常を見出した。AIPを制御する可能性のある因子であり、AIP発症を防ぐことにつながる可能性がある。候補遺伝子の解析を続ける予定である。

#### 研究成果の学術的意義や社会的意義

自己免疫性膵炎(AIP)発症メカニズムについては、いまだ不明な点が多い。AIPにおいて様々なサイトカインが病態形成に関与していることが知られている。そこでAIPで生じる線維化や高IgG4血症を生じさせるサイトカイン異常がメチル化異常によって誘発されているという仮説を立て、病理学的、分子生物学的視点から検証した。アレイ解析でそれらに系統的な特異なメチル化異常は見いだせなかった。一方で解析の中で、炎症全体を制御するサイトカイン関連因子にメチル化異常が生じていた。AIPを制御する可能性のある因子を見出したことは、AIP発症を防ぐことにつながる可能性があり、学術的意義および社会的意義がある。

研究成果の概要(英文)：We performed whole-genome methylation profiling using the Infinium MethylationEPIC Kit (Illumina, USA) to identify methylation abnormalities of cytokines and cytokine-related factors in autoimmune pancreatitis (AIP). Methylation array analysis was performed on the inflammatory area of AIP, the obstructive pancreatitis area of pancreatic cancer, and the respective lymph nodes. No systematic methylation abnormalities were found in the heat map analysis. On the other hand, during the analysis, we found methylation aberrations in cytokine-related factors that may regulate overall inflammation, factors that may regulate AIP and may lead to prevention of AIP development. We plan to continue analysis of candidate genes.

研究分野：人体病理

キーワード：自己免疫性膵炎 サイトカイン メチル化アレイ解析

## 1. 研究開始当初の背景

IgG4 関連疾患は様々な臓器に発生し、臓器の腫大や線維化を生じ機能障害を生じる疾患である。血清学的には IgG4 高値が指摘され、病理像はリンパ球と形質細胞を主体とした著明な細胞浸潤と線維化で、形質細胞の多くは IgG4 陽性を示す。さらにステロイドが著効してこれらの所見が改善する特異的な慢性炎症である。比較的高齢者に多く、近年増加傾向にある。自己免疫性膵炎 (autoimmune pancreatitis: AIP) は、IgG4 関連疾患を代表する疾患であり、共通の臨床病理学的所見や、主膵管のびまん性狭窄を特徴とする。

AIP は 2001 年に信州大学医学部附属病院消化器内科の浜野らにより、血清学的に IgG4 の上昇がみられることが発見され、病因を解明するための糸口がつかめた(Hamano et al. The New England Journal of Medicine, 2001)。本研究には申請者も黎明期より参加して病理学的解析を担当している。病理組織学的解析では、膵管周囲に多数の IgG4 陽性の形質細胞の浸潤が認められる特徴がある。また後腹膜線維症、シェーグレン症候群、硬化性胆管炎や前立腺炎など多くの炎症性疾患が合併もしくは単独発生することが知られており、これらを前述したように IgG4 関連疾患と呼んでいる。

申請者はこれまで AIP に合併する硬化性胆管炎、前立腺炎、胃炎、リンパ節炎の病理組織学的検討(上原ら Pathol International, 2005) (上原ら Pathol International, 2008) (上原ら American journal of Surgical Pathology, 2010) (上原ら Annals of Diagnostic Pathology, 2013) を行ってきた。また、AIP に合併した硬化性胆管炎と、原発性硬化性胆管炎(primary sclerosing cholangitis ; 以下 PSC)を病理組織学的に比較検討し、AIP に合併する硬化性胆管炎には膵臓に見られるものと同様に IgG4 陽性形質細胞の浸潤などの特徴的な所見が見られ、ステロイド治療が著効することを報告した(上原ら Pathol International, 2005)。さらに AIP に合併する前立腺炎、胃炎、リンパ節炎においても AIP と同様の病態が認められ、ステロイド治療が著効するものがあると報告するなど(上原ら Pathol International, 2008) (上原ら American journal of Surgical Pathology, 2010) (上原ら Annals of Diagnostic Pathology, 2013)、AIP に関連する前立腺炎、胃炎、リンパ節炎の存在を明らかにしてきた。

慢性胃炎や炎症性腸疾患など多くの炎症性疾患は発癌と関与しており、その原因はメチル化異常が関与している。そこで申請者は発癌と AIP の関係にも早くから着目し、AIP と膵臓癌での線維化巣の病理組織学的検討(上原ら Pathol International, 2014)を行ってきた。メチル化アレイ解析によって、これまでの病理組織学的な知見を踏まえ、分子病理学的手法を導入して発癌の予防や治療に応用できる確実な診断方法の確立を目指した解析を行った。メチル化アレイ解析など分子生物学的手法によって、AIP においても膵癌で報告のある、腫瘍抑制遺伝子などでメチル化異常を有していることを明らかにし、発がんとの関連を指摘した(衣川、上原ら Pancreas, 2017) (衣川、上原ら Pathol Res Pract, 2018)。

AIP を含む IgG4 関連疾患の原因はいまだ明らかではない。様々な方向からのアプローチによる原因究明が治療方法や発症予防につながると考えられる。中でもサイトカインの異常は AIP でもよく知られており、これらの制御に関して注目が集まっている。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、エピゲネティックな手法やサイトカイン発現解析などを用いて、AIP ならびに IgG4 関連疾患での IgG4 産生や線維化を制御するサイトカインのエピゲネティックな異常の解明を行う。

## 3. 研究の方法

選択症例から保存病理検体を集め、AIP における線維化や IgG4 陽性形質細胞浸潤の原因となるようなエピゲネティック異常が生じているか網羅的メチル化アレイ解析法を行い、AIP の病因解明を目指す。サイトカイン関連遺伝子のメチル化状態のヒートマップ作製を行い系統的なメチル化異常が生じている可能性についても検討する。再検証には定量 Methylation Specific PCR(MSP)法を用い、特定した遺伝子の mRNA 発現解析や免疫染色を行う。

## 4. 研究成果

AIP の線維化および炎症制御に関わるサイトカインに関連する転写因子産生細胞のメチル化レベルを Infinium MethylationEPIC BeadChip で解析を行った後に、AIP に関連する可能性のあるサイトカインないしはサイトカイン関連因子 9 種類(TGF ベータ、TNF アルファ、TNF ガンマ、IL-4、IL-6、IL-10、IL2RB、VEGF、IL-7)のメチル化レベルについてヒートマップ作製を行い解析した。ヒートマップによるメチル化アレイ解析は AIP の炎症部、膵臓癌の閉塞性膵炎部およびそれぞれの所属リンパ節に対して行った。ヒートマップ解析からはサイトカインないしはサイトカイン関連因子に、散発性の疾患特異的なメチル化異常を数か所に認めた。しかしながら系統的な特異なメチル化異常は見いだせなかった。一方で解析の中で、炎症全体を制御するサイトカイン関連因子に疾患特異的な特異なメチル化異常が生じていることを見出した。炎症全体を制御する可能性があるメチル化異常を呈している因子に関しては正確なメチル化レベルを得るために、症例数を増やして定量的メチル化解析法である、定量 Methylation Specific PCR(MSP)を用いて、メチル化レベルを解析した。対象疾患でメチル化異常が認められることを同定し、アレイ解析とほぼ同様の結果を得ている。またサイトカイン関連因子の発現に関しては、

古い検体もあるので mRNA 解析ではなく、免疫染色を行いタンパクの発現について解析中である。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計9件（うち査読付論文 9件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Usami Yoko, Sugano Mitsutoshi, Uehara Takeshi, Koinuma Masayoshi, Ishimine Nau, Kawasaki Kenji, Yamauchi Kazuyoshi, Hamano Hideaki, Honda Takayuki	4. 巻 11
2. 論文標題 Cut-off values of serum IgG4 among three reagents, including a novel IgG4 reagent: a multicenter study	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-021-86024-5	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Hori Yasuki, Chari Suresh T., Tsuji Yoshihisa, Takahashi Naoki, Inoue Dai, Hart Phil A., Uehara Takeshi, Horibe Masayasu, Yamamoto Satoshi, Satou Akira, Zhang Lizhi, Notohara Kenji, Naitoh Itaru, Nakazawa Takahiro	4. 巻 5
2. 論文標題 Diagnosing Biliary Strictures	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Mayo Clinic Proceedings: Innovations, Quality & Outcomes	6. 最初と最後の頁 535 ~ 541
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.mayocpiqo.2021.03.005	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
1. 著者名 Kinugawa Yasuhiro, Uehara Takeshi, Iwaya Mai, Asaka Shiho, Kobayashi Shota, Nakajima Tomoyuki, Komatsu Masamichi, Yasuo Masanori, Yamamoto Hiroshi, Ota Hiroyoshi	4. 巻 21
2. 論文標題 IL-6 expression helps distinguish Castleman's disease from IgG4-related disease in the lung	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 BMC Pulmonary Medicine	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s12890-021-01603-6	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Notohara Kenji, Kamisawa Terumi, Furukawa Toru, Fukushima Noriyoshi, Uehara Takeshi, et.al	4. 巻 480
2. 論文標題 Concordance of the histological diagnosis of type 1 autoimmune pancreatitis and its distinction from pancreatic ductal adenocarcinoma with endoscopic ultrasound-guided fine needle biopsy specimens: an interobserver agreement study	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Virchows Archiv	6. 最初と最後の頁 565 ~ 575
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00428-021-03236-w	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Ozawa Y, Yamamoto H, Yasuo M, Komatsu M, Ushiki A, Hamano H, Uehara T, Kawakami S, Fujita A, Fujinaga Y, Oguchi K, Kawa S, Hanaoka M	4. 巻 82
2. 論文標題 A comparison of the features of fluorine-18 fluorodeoxyglucose-positron emission tomography (FDG-PET) between IgG4-related disease with bilateral hilar lymphadenopath	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Nagoya J Med Sci	6. 最初と最後の頁 101-111
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.18999/nagjms.82.1.101.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Notohara K, Kamisawa T, Fukushima N, Furukawa T, Tajiri T, Yamaguchi H, Aishima S, Fukumura Y, Hirabayashi K, Iwasaki E, Kanno A, Kasashima S, Kawashima A, Kojima M, Kubota K, Kuraishi Y, Mitsuhashi T, Naito Y, Naitoh I, Nakase H, Nishino T, Ohike N, Sakagami J, Shimizu K, Shiokawa M, Uehara T, et al.	4. 巻 70
2. 論文標題 Guidance for diagnosing autoimmune pancreatitis with biopsy tissues	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Pathol Int	6. 最初と最後の頁 699-711
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/pin.12994.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kuraishi Y, Uehara T, Watanabe T, Ashihara N, Ozawa M, Kanai K, Kawa S: Corticosteroids prevent the progression of autoimmune pancreatitis to chronic pancreatitis.	4. 巻 20
2. 論文標題 Corticosteroids prevent the progression of autoimmune pancreatitis to chronic pancreatitis	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Pancreatology	6. 最初と最後の頁 1062-1068
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.pan.2020.07.408.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Nakata R, Uehara T, Iwaya M, Asaka S, Kobayashi S, Sugano M, Higuchi K, Kusama Y, Nakazawa K, Nakaguro M, Kobayashi M, Tateishi A, Makino M, Kawaguchi K, Maejima T, Ishii K, Sano K, Shimojo H, Hori A, Otsuki T, Hamano H, Kawa S, Ota H	4. 巻 28
2. 論文標題 Immunostaining With Immunoglobulin G Subclass Antibody Cocktail for Diagnosis of Type 1 Autoimmune Pancreatitis	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Int J Surg Pathol	6. 最初と最後の頁 844-849
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1177/1066896920924781.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Uchino K, Notohara K, Uehara T, Kuraishi Y, Itakura J, Matsukawa A	4. 巻 71
2. 論文標題 Utility of gastric biopsy in diagnosing IgG4-related gastrointestinal disease	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Pathol Int	6. 最初と最後の頁 124-134
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/pin.13059.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 能登原 憲司, 神澤 輝実, 古川 徹, 福嶋 敬宜, 上原 剛, 笠島 里美, 池浦 司, 川 茂幸, 岡崎 和一
2. 発表標題 EUS-FNB検体による1型自己免疫性膵炎の生検診断についての診断者間一致の検討
3. 学会等名 第111回日本病理学会総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 吉澤 隆裕, 清水 明, 上原 剛, 窪田 晃治, 野竹 剛, 増尾 仁志, 坂井 紘紀, 細田 清孝, 林 輝, 副島 雄二
2. 発表標題 肝内胆管癌におけるIgG4の発現と予後
3. 学会等名 日本消化器外科学会総会 77回
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	松田 和之  (Matsuda Kazuyuki)  (00647084)	信州大学・学術研究院保健学系・教授    (13601)	

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分 担 者	増本 純也  (Masumoto Junya)  (20334914)	愛媛大学・プロテオサイエンスセンター・教授    (16301)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関